

## INFECCIÓN POR *BONAMIA EXITIOSA*

---

### 1. **Ámbito de aplicación**

*Bonamia exitiosa* es un parásito protozoario del filum *Haplosporidia* (Carnegie y Cochenec-Laureau, 2004) que infecta los hemocitos de varias especies de ostras e induce trastornos de la fisiología y finalmente la muerte del animal (Cranfield *et al.*, 2005; Dinamani *et al.*, 1987). A efectos de este capítulo, la infección por *Bonamia exitiosa* se considera una infección por *B. exitiosa*, anteriormente denominado *B. exitiosus* (Berthe y Hine, 2003; Hine *et al.*, 2001). Esta definición excluye infecciones por *B. ostreae* (Pichot *et al.*, 1979), *B. roughleyi* (Cochennec *et al.*, 2003; Farley *et al.*, 1988) y *B. perspora* (Carnegie *et al.*, 2006). Lo casos de *Bonamia* spp. que no se hayan identificado hasta el nivel de especie (Burreson *et al.*, 2004; Campalans *et al.*, 2000; Kroeck y Montes, 2005) deben trasladarse al Laboratorio de Referencia de la OIE correspondiente.

### 2. **Información sobre la enfermedad**

#### 2.1. **Factores del agente**

##### 2.1.1. **El agente patógeno, cepas del agente**

*Bonamia exitiosa* (Berthey Hine, 2003; Hine *et al.*, 2001); no se ha identificado ninguna cepa.

##### 2.1.2. **Supervivencia fuera del hospedador**

Actualmente no se tiene constancia.

##### 2.1.3. **Estabilidad del agente patógeno (métodos eficaces de inactivación)**

Actualmente no se conoce ninguno.

##### 2.1.4. **Ciclo de vida**

Es posible que tenga lugar una transmisión del parásito directamente entre hospedadores, y se sospecha de una transmisión por la vehiculación pasiva en las corrientes de estadios infectivos entre lechos de ostras (Cranfield *et al.*, 2005; Hine, 1996).

#### 2.2. **Factores del hospedador**

##### 2.2.1. **Especies hospedadoras susceptibles**

Son susceptibles las especies de ostras *Ostrea chilensis* (= *Tiostrea chilensis* = *T. lutaria*) (Dinamani *et al.*, 1987), *O. angasi* (Corbeil *et al.*, 2006b; Hine, 1996; Hine y Jones, 1994), *O. edulis* (Abollo *et al.*, 2008; Narcisi *et al.* 2010) y *O. stentina* (Hill *et al.*, 2010).

##### 2.2.2. **Fases susceptibles de la vida del hospedador**

En el caso de *O. chilensis*, se sabe que son susceptibles las ostras en tamaño de reclutamiento (ostras de 58 mm de longitud o mayores) (Dinamani *et al.*, 1987). En el caso de *O. edulis*, el parásito se ha detectado en ostras de tamaño comercial (>60 mm) (Abollo *et al.*, 2008). No se dispone de datos respecto a ningún otro estadio de las ostras, incluidas las larvas.

Recientemente se ha detectado ADN de *B. exitiosa* en larvas de ostra europea (*Ostrea edulis*) (Arzul *et al.*, 2010).

##### 2.2.3. **Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)**

*Ostrea chilensis* y *O. angasi* (Dinamani *et al.*, 1987; Hine y Jones, 1994) de 58 mm de longitud o mayores. En *O. chilensis*, la intensidad media de infección por *Bonamia* fue significativamente mayor en hembras y en ostras desovadas que en machos y en ostras hermafroditas (Hine *et al.*, 2002).

### 2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

*Bonamia exitiosa* es un protozoo intrahemocítico, pero puede observarse extracelularmente (Dinamani *et al.*, 1987). Este protozoo intrahemocítico se convierte rápidamente en sistémico y puede hallarse en distintos órganos, sobre todo en los tejidos conjuntivos de las branquias y del manto (Hine, 1991a). En *Ostrea angasi*, el parásito es epiteliotrópico, e infecciones aparentemente muy leves pueden causar una infiltración masiva local de hemocitos con focos necróticos. En *O. edulis*, el parásito se asocia a infiltración hemocítica intensa y aparece en el tejido conjuntivo de distintos órganos, principalmente dentro de los hemocitos, pero a veces también fuera de las células hospedadoras (Abollo *et al.*, 2008). En *O. stentina*, no se observó hemocitosis en animales que estaban infectados por el parásito (Hill *et al.*, 2010).

### 2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

La infección a menudo es mortal, en función del hospedador y de las condiciones ambientales.

### 2.2.6. Vectores

Ninguno identificado.

La detección de ADN de *B. exitiosa* en *Crassostrea gigas* sugiere que esta especie podría actuar como portadora o reservorio de *B. exitiosa* (Lynch *et al.*, 2010).

### 2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

*Bonamia exitiosa* suele infectar a poblaciones salvajes de especies susceptibles (véase el apartado 2.2.1).

## 2.3. Patrón de la enfermedad

### 2.3.1. Mecanismos de transmisión

En *O. chilensis* es posible la transmisión del parásito directamente entre hospedadores. Las ostras ingieren partículas infectivas liberadas y entran en la hemolinfa procedentes del intestino (Hine, 1991a; 1991b). Las partículas infectivas son fagocitadas por hemocitos agranulares, pero pueden resistir a la lisis dentro del hemocito (Hine y Wesley, 1994).

Se detectó ADN del parásito en larvas incubadas en la cavidad paleal de ostras adultas, lo cual sugiere una posible transmisión entre estos dos grupos de edad. Así, las larvas podrían contribuir a la propagación del parásito durante su vida planctónica (Arzul *et al.*, 2010).

### 2.3.2. Prevalencia

La prevalencia en *O. chilensis* es variable (de entre el 0% y casi el 80%) (Cranfield *et al.*, 2005; Diggles *et al.*, 2002). En el hemisferio sur, la infección por *B. exitiosa* presenta la máxima prevalencia entre enero y abril, y el parásito es prácticamente indetectable en septiembre y octubre (Hine, 1991a). Factores estresantes, como la exposición a temperaturas (inferiores a los 7º o superiores a los 26ºC) y salinidades (40%) extremas, el ayuno (permanencia en agua marina filtrada durante largos periodos de tiempo), la manipulación (un agitación enérgica cuatro veces al día) o una infección intensa por parásitos del filum Apicomplexa (Hine, 2002), pueden afectar a la dinámica de la enfermedad causada por *B. exitiosa* en *O. chilensis* (Hine *et al.*, 2002). En Galicia (España), la máxima prevalencia notificada de *B. exitiosa* en *O. edulis* fue del 34% en un lote recogido en octubre (Abollo *et al.*, 2008). A pesar de ciertas diferencias de prevalencia observadas entre distintas fechas de muestreo, actualmente no se puede determinar cuál es el patrón de infección anual de la ostra europea por *B. exitiosa* en Europa.

En *O. edulis* la prevalencia es variable, en cuyo molusco se ha observado coinfección con *B. ostreae* (Abollo *et al.*, 2008).

### 2.3.3. Distribución geográfica

En *O. chilensis* se ha hallado infección por *B. exitiosa* en el estrecho de Foveaux y en otros lugares de la isla Sur de Nueva Zelanda (Dinamani *et al.*, 1987; Doonan *et al.*, 1994); en *O. angasi*, en Australia (Bahía Port Philip, Victoria; Bahía Georges, Tasmania; y Albany, Australia occidental) (Corbeil *et al.*, 2006b; Hine, 1996; Hine y Jones, 1994); en *O. edulis*, en Galicia (Spain) (Abollo *et al.*, 2008), en Italia (Mar Adriático) (Narcisi *et al.* 2010), en Francia (Mar Mediterráneo) y en el Reino Unido (Cornwall); y en *O. stentina*, en Túnez (Hill *et al.*, 2010).

#### 2.3.4. Mortalidad y morbilidad

La infección suele ser mortal. En *O. chilensis*, la muerte suele tener lugar de forma simultánea a la máxima intensidad de infección, en concreto asociada a infecciones muy intensas por parásitos del filum Apicomplexa (Hine, 2002; Hine y Wesley, 1994). La enfermedad parece matar más del 80% de las ostras porque la ola de la infección pasa por un lecho de ostras a lo largo de un periodo de 2-3 años (Cranfield *et al.*, 2005). Todavía no se ha evaluado el impacto de *B. exitiosa* en *O. edulis* ni en *O. stentina*.

#### 2.3.5. Factores ambientales

La prevalencia fue más alta en ostras mantenidas durante un corto periodo de tiempo (14 días) en agua tibia (25-26°C) durante 1 hora al día o en agua hipersalina (39–40‰) que en agua fría (7°C durante 1 hora al día) y en agua hiposalina (15‰) (Hine *et al.*, 2002). Sin embargo, en este estudio se utilizó la variación de temperatura y de salinidad como factor estresante.

En *O. chilensis*, la prevalencia sigue un patrón anual con dos picos, uno en abril (principios de otoño) y uno en agosto (invierno) (Hine, 1991a). Todavía no se ha estudiado la evolución de *B. exitiosa* en *O. edulis* ni en *O. stentina* en función de la estación del año.

### 2.4. Control y prevención

#### 2.4.1. Vacunación

Ninguna.

#### 2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

Ninguno.

#### 2.4.3. Inmunoestimulación

Ninguna.

#### 2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Ninguna.

#### 2.4.5. Repoblación con especies resistentes

Ninguna.

#### 2.4.6. Agentes bloqueantes

Ninguno.

#### 2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

No se dispone de datos.

#### 2.4.8. Prácticas generales de manejo

El desarrollo de dragas más ligeras y de estrategias de pesca menos agresivas debería reducir la probabilidad de que surgieran brotes de la enfermedad, porque se reduciría la perturbación de los moluscos (Cranfield *et al.*, 2005). Evitar factores estresantes como la exposición a temperaturas (inferiores a los 7°C o superiores a los 26°C) y a salinidades (40‰) extremas, el ayuno, la manipulación o infecciones intensas por otros parásitos, así como disminuir la densidad, debería ayudar a reducir el impacto de la enfermedad (Cranfield *et al.*, 2005; Hine *et al.*, 2002).

### 3. Obtención de muestras

#### 3.1. Elección de ejemplares

Prioritariamente deben escogerse ejemplares moribundos o que acaben de morir (de 2 o más años), para aumentar la probabilidad de encontrar ostras infectadas. Para la histología, solo deben escogerse ostras vivas (pueden incluirse moribundas).

Debe organizarse la obtención de ostras de modo que se lleve a cabo una vez al año, cuando se sepa que la prevalencia es máxima. Cuando no se disponga de este dato en un ecosistema determinado, en el hemisferio sur la obtención de muestras debe llevarse a cabo preferiblemente entre enero y abril (Hine, 1991a).

### 3.2. Conservación de muestras para su envío

Para la histología, el mejor conservante es el AFA de Davidson, pero también es aceptable la formalina tamponada al 10% u otros fijadores estándar para histología. Para las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las muestras deben conservarse en etanol al 95-100% y en alcohol no desnaturalizado.

### 3.3. Combinación de varias muestras

La combinación de varias muestras podría ser aplicable, pero no se ha evaluado cómo influye en el rendimiento de las pruebas diagnósticas.

### 3.4. Órganos y tejidos de elección

Para el diagnóstico de *B. exitiosa* por histología se utiliza un corte de tejido de 3-5 mm de espesor de branquias, manto, gónadas o glándula digestiva. Para ciertas pruebas, como las improntas o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son preferibles las branquias y/o el corazón.

### 3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Los tejidos distintos de las branquias, el corazón y el manto son menos adecuados.

## 4. Métodos de diagnóstico

### 4.1. Métodos de diagnóstico de campo

#### 4.1.1. Signos clínicos

Los signos clínicos son la presencia de ostras muertas o moribundas, pero no es patognomónica de la infección por *B. exitiosa* y podría indicar otras infecciones.

#### 4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Presencia de ostras moribundas.

### 4.2. Métodos clínicos

#### 4.2.1. Anatomopatología macroscópica

La mayoría de ostras vivas infectadas tiene un aspecto normal, pero a veces las branquias pueden estar erosionadas (Dinamani *et al.*, 1987).

#### 4.2.2. Bioquímica clínica

Ninguna.

#### 4.2.3. Anatomopatología microscópica

En *O. chilensis*, aparecen lesiones en el tejido conjuntivo de las branquias y del manto, y en los senos vasculares situados alrededor del estómago y del intestino. La capa subepitelial del tejido conjuntivo del manto, que está infiltrada por grupos de hemocitos granulares parasitados, presenta un aspecto disociado (Dinamani *et al.*, 1987). En infecciones aparentemente leves de los epitelios de las branquias y de los divertículos digestivos de *O. angasi*, la presencia intracelular de *B. exitiosa*, que apenas adquiere un tono basófilo claro en la tinción, da lugar a una hiperplasia epitelial masiva. En *O. edulis*, el parásito se detectó en el tejido conjuntivo de distintos órganos asociado a una intensa infiltración de hemocitos (Abollo *et al.*, 2008).

#### 4.2.4. Preparaciones húmedas

Ninguna.

#### 4.2.5. Improntas

Pueden observarse microorganismos esféricos u ovoides (de 2-5 µm de ancho) dentro de los hemocitos en improntas de corazón o de branquias.

#### 4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

En infecciones avanzadas, puede observarse el parásito dentro de los hemocitos.

### 4.3. Métodos de detección e identificación del agente

#### 4.3.1. Métodos directos de detección

##### 4.3.1.1. Métodos microscópicos

###### 4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

Ninguna.

###### 4.3.1.1.2. Improntas

*Muestras a obtener:* ostras desovadas o ventrículo cardíaco o branquias de hospedadores vivos de 2 años de edad o más.

*Procedimiento técnico:* tras secar los tejidos sobre papel absorbente, se llevan a cabo varias improntas sobre un porta de vidrio. Los portas se secan al aire, se fijan en metanol o en etanol absoluto y se tiñen utilizando un kit comercial de tinción de sangre, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras enjuagarlos en agua de grifo y secarlos, los portas se montan con un cubreobjetos utilizando una resina sintética adecuada. Los portas se observan primero a 200 aumentos y a continuación con aceite de inmersión a 1.000 aumentos.

*Controles positivos:* son recomendables y se adquieren en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* la especificidad es baja, pero la sensibilidad es mejor que la del examen histológico (Diggles *et al.*, 2003). En comparación con la PCR y la hibridación *in-situ* (ISH) combinadas, en *O. chilensis* las improntas de corazón tienen una sensibilidad del 59,3% y una especificidad del 100% (Diggles *et al.*, 2003).
- *Método de referencia:* la sensibilidad de las improntas de tejidos es más alta que la de la histología, que es el método de referencia, aunque no es específica de la especie del parásito.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la presencia de pequeños microorganismos esféricos u ovoides (de 2–5 µm de ancho) dentro de los hemocitos. Sin embargo, también es posible observar el parásito extracelularmente. Estos microorganismos tienen un citoplasma basófilo y un núcleo eosinófilo (los colores pueden variar en función de la tinción utilizada) y, dado que se esparcen sobre el porta, pueden parecer más grandes en improntas que en preparaciones histológicas.
- En especies susceptibles de la zona en la que se sabe que existe infección por *B. exitiosa*, un resultado positivo en *O. chilensis* o en *O. angasi* indica infección por *B. exitiosa*, pero en *O. edulis* puede indicar infección tanto por *B. exitiosa* como por *B. ostreae*.
- En otras especies o fuera de la zona geográfica en la que se sabe que existe infección por *B. exitiosa*, un resultado positivo indica infección por una especie del género *Bonamia* que tendrá que confirmarse en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

*Disponibilidad de pruebas comerciales:* se comercializan kits de tinción rápida (como por ejemplo, Hemacolor®).

###### 4.3.1.1.3. Cortes fijados

###### 4.3.1.1.3.1. Histología

*Muestras a obtener:* Ostras vivas o que acaben de morir.

*Procedimiento técnico:* deben fijarse durante 24 h en fijador de Davidson o en otros fijadores estándar para histología, como formalina tamponada al 10%, cortes de tejido que incluyan branquias, glándula

digestiva, manto y gónadas. A continuación, se aplica el proceso normal de inclusión en parafina y tinción, por ejemplo, con hematoxilina y eosina. Las observaciones se realizan a aumentos crecientes, hasta llegar a los x1000.

**Controles positivos:** son recomendables y se adquieren en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Niveles de validación:

- **Especificidad y sensibilidad:** en *O. chilensis*, la especificidad es baja, pero la sensibilidad es buena en infecciones de intensidad moderada a alta, y baja en infecciones de baja intensidad. En comparación con la PCR combinada con ISH, la histología tiene una sensibilidad del 44% (inferior a la de las improntas de corazón) y una especificidad del 100% (Diggle *et al.*, 2003).
- **Método de referencia:** la histología es el método de referencia y es el método de vigilancia recomendado en zonas solo infectadas por *B. exitiosa*. Sin embargo, en zonas donde coexisten *B. exitiosa* y *B. ostreae*, un resultado positivo en la histología tendrá que confirmarse mediante caracterización molecular.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la presencia, en *O. chilensis*, de parásitos en forma de células muy pequeñas, de 2-5 µm de ancho, dentro de los hemocitos o libres en el tejido conjuntivo o en el epitelio de los senos de las branquias, del intestino y del manto. A menudo se asocian a una intensa infiltración diseminada de hemocitos en *O. chilensis*, mientras que en *O. angasi* se asocian a una intensa infiltración focal de hemocitos. Para evitar posibles dudas, solo se diagnosticará la enfermedad si se observa el parásito dentro de los hemocitos. Esta técnica no es específica de especie.
- En especies susceptibles de la zona en la que se sabe que existe infección por *B. exitiosa*, un resultado positivo en *O. chilensis* o en *O. angasi* indica infección por *B. exitiosa*, pero en *O. edulis* puede indicar infección tanto por *B. exitiosa* como por *B. ostreae*.
- En otras especies o fuera de la zona geográfica en la que se sabe que existe infección por *B. exitiosa*, un resultado positivo indica infección por una especie del género *Bonamia* que tendrá que confirmarse en el Laboratorio de Referencia de la OIE

**Disponibilidad de pruebas comerciales:** no existen pruebas comerciales.

#### 4.3.1.1.3.2. Microscopía electrónica de transmisión

**Muestras a obtener:** Ostras vivas o que acaben de morir.

**Procedimiento técnico:** debe fijarse un trozo pequeño (1-2 mm) de tejido en glutaraldehído al 3% (en agua de mar filtrada por un tamaño de poro de 0,22 µm [FSW]) durante 1 hora, lavarse tres veces en FSW, fijarse en ácido ósmico al 1% y lavarse dos veces más de FSW. Tras la deshidratación en baños sucesivos de etanol, y dos baños de óxido de propileno, las muestras deben impregnarse progresivamente e incluirse en Epon. Tras la polimerización a 60°C, deben realizarse cortes de los bloques de 0,5-1 µm de espesor para el control de calidad, y después de 80-100 nm para el examen al microscopio electrónico. Se depositan cortes ultrafinos en rejillas de malla de cobre y se les aplica una tinción de contraste utilizando acetato de uranilo y citrato de plomo.

**Controles positivos:** ninguno.

Niveles de validación:

- **Especificidad y sensibilidad:** la especificidad es mejor que la de las improntas o la histología. La microscopía electrónica de transmisión (MET) permite diferenciar *B. exitiosa* de otras microcélulas estrechamente relacionadas, como *B. ostreae*.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la presencia de parásitos dentro de los hemocitos. En *O. chilensis*, se han descrito cuatro fases de desarrollo del parásito en ostras infectadas, que corresponden a las formas densas (Estado 1), las formas intermedias (Estado 2), las formas plasmodiales (Estado 3) y las formas vacuoladas (Estado 4) (Hine, 1991b; Hine *et al.*, 2001). Las estructuras intracelulares son mitocondrias, haplosporosomas, aparato de Golgi y microtúbulos intranucleares persistentes.
- A diferencia de otros haplosporidios, como *B. ostreae*, en *B. exitiosa* se ha observado una fase que contiene una gran vacuola derivada del aumento de tamaño de una o más mitocondrias (Hine, 1991b; Hine *et al.*, 2001). Las formas densas de *B. exitiosa* son ligeramente más grandes

(diámetro medio de 61 parásitos =  $3 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ) que las de *B. ostreae*, (diámetro medio de 64 parásitos =  $2,4 \pm 0,5 \mu\text{m}$ ) y tienen más haplosporosomas, perfiles mitocondriales y cuerpos lipoides por área de ultraestructura, así como mitocondrias tubulo-vesiculares más pequeñas. Además, las formas densas, aunque no las claras, de *B. ostreae* carecen de complejos de aparato de Golgi/copa nuclear unidos a la membrana nuclear, y de fase vacuolada (Hine *et al.*, 2001).

*Disponibilidad de pruebas comerciales:* no existen pruebas comerciales.

#### 4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

##### 4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

No se dispone de ninguno.

##### 4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

Actualmente no existe ninguno, pero uno de los dos anticuerpos monoclonales generados contra la membrana celular de *B. ostreae* reaccionó con *B. exitiosa* (Mialhe *et al.*, 1988).

##### 4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

###### 4.3.1.2.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

*Muestras a obtener:* ostras vivas o que acaben de morir.

*Procedimiento técnico:* se introducen muestras de tejido en etanol al 95-100% o se congelan hasta que se extraiga el ADN. La extracción del ADN se lleva a cabo mediante digestión con proteinasa K durante toda la noche a 50°C, y extracción con fenol-cloroformo con precipitación mediante etanol (Cochennec *et al.*, 2000).

Se ha observado que un protocolo de PCR desarrollado para la detección de *B. ostreae* permite la detección de *B. exitiosa* (Carnegie y Cochennec-Laureau, 2004; Diggles *et al.*, 2003; Hine *et al.*, 2001). El par de cebadores Bo-Boas (5'-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3' y 5'-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3', respectivamente) amplifica un producto de 304 pb del ADNr de la región de la subunidad pequeña (SSU) (Cochennec *et al.*, 2000). Las mezclas para la PCR contienen tampón (KCl 500 mM, Tris/HCl 100 mM [pH 9,0 a 25°C] y Triton<sup>®</sup> X-100 al 1%), MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, mezcla de dNTP a una concentración de 0,2 mM, cebadores directo e inverso 1  $\mu\text{M}$ , 0,02 unidades/ $\mu\text{l}$  de ADN polimerasa Taq, y 0,2 ng/ $\mu\text{l}$  del ADN molde en un volumen total de 50  $\mu\text{l}$ . Las muestras se desnaturalizan en un termociclador durante 5 minutos a 94°C antes de ser sometidas a 30 ciclos (94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto), seguidos de una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Un segundo par de cebadores, C<sub>F</sub> y C<sub>R</sub> (5'-CGG-GGG-CAT-AAT-TCA-GGA-AC-3' y 5'-CCA-TCT-GCT-GGA-GAC-ACA-G-3', respectivamente), también diseñado para amplificar un producto de 760 pb de ADNr de la SSU de *B. ostreae*, debería amplificar *B. exitiosa* (Carnegie y Cochennec-Laureau, 2004).

Para la detección de *Bonamia* spp. también puede utilizarse una prueba de PCR TaqMan utilizando cebadores y sonda que accedan a la región del ITS1 (espaciador transcrito interno) (Corbeil *et al.*, 2006a). Tiene buena sensibilidad; esta prueba no amplifica *Haplosporidium nelsoni*, *H. costale* ni *Mikrocytos mackini*, pero todavía no está del todo validada.

*Controles positivo/negativo:* son obligatorios. Los controles positivos son: 1) PCR con cebadores específicos del ADN genómico de hospedadores muy infectados o ADN de parásitos purificados; 2) productos de una amplificación inespecífica (actina, SSU, etc.). Los controles negativos son: 3) reacciones de ADN no diana; 4) PCR con cebadores específicos de ADN genómico de hospedadores no infectados. Los controles positivos pueden adquirirse previa petición en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* debido a la similitud con la secuencia de ADN diana, el par de cebadores Bo-Boas debe amplificar todos los haplosporidios microcelulares (Carnegie y Cochennec-Laureau, 2004). La sensibilidad de la prueba es mejor que la de la histología, pero peor que la de la hibridación *in-situ* (Diggles *et al.*, 2003).

- **Método de referencia:** en comparación con la combinación de histología e improntas de corazón, y considerando que estas técnicas tienen un 100% de sensibilidad y de especificidad, la PCR tiene una sensibilidad del 88,2% (inferior a la de la ISH) y una especificidad del 36,4% (Diggles *et al.*, 2003).

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es un amplicón del tamaño adecuado, cuando todos los controles negativos dan un resultado negativo y todos los controles positivos, un resultado positivo.
- La PCR no es específica de especie. La secuencia de ADNr del gen de la SSU de *Bonamia exitiosa* presenta polimorfismo con la de *B. ostreae* y *B. roughleyi* en el análisis de los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) tras una digestión con *Bgl* I y *Hae* II de los productos obtenidos en la PCR realizada con los cebadores Bo-Boas. *Bonamia ostreae* y *B. exitiosa* presentan el mismo perfil (dos productos de 115 y de 189 pb) cuando se digieren con *Hae* II, mientras que el producto de la PCR de *B. roughleyi* no se digiere. El perfil de *B. ostreae* consiste en dos bandas de 120 y de 180 pb cuando se digiere con *Bgl* I, mientras que los productos de la PCR de *B. exitiosa* y *B. roughleyi* no se digieren (Carnegie y Cochenne-Laureau, 2004; Hine *et al.*, 2001). Sin embargo, según el análisis de la secuencia, la PCR-RFLP no distingue *B. exitiosa*, y otras cepas relacionadas, de *B. perspora*.
- En *O. chilensis* y *O. angasi* de Nueva Zelanda y de Australia, respectivamente, un resultado de PCR-RFLP esperado, asociado a un resultado positivo por histología o improntas, confirma la infección por *B. exitiosa*;
- En otras especies, o fuera de la zona geográfica en la que se sabe que hay infección por *B. exitiosa*, un resultado de PCR-RFLP esperado, asociado a un resultado positivo por histología o improntas, es muy indicativo de una infección por *B. exitiosa*, pero para confirmar el diagnóstico es necesaria una secuenciación del producto de la PCR y, si es posible, una observación mediante MET.

**Disponibilidad de pruebas comerciales:** no existen pruebas comerciales.

#### 4.3.1.2.3.2. Hibridación in-situ (ISH)

Muestras a obtener: ostras vivas o que acaben de morir.

**Procedimiento técnico:** se ha observado que un protocolo de ISH desarrollado para detectar *B. ostreae* permite detectar *B. exitiosa* (Cochenne *et al.*, 2000; Diggles *et al.*, 2003). En esta prueba se utiliza una sonda de 300 pb marcada con digoxigenina que accede al ADNr del gen de la SSU. Se introducen muestras de tejido en fijador de Davidson durante 24 horas y a continuación se incluyen en parafina. Se realizan cortes de 5 µm de espesor, se depositan sobre portas recubiertos de silano y después se dejan durante toda la noche en un horno a 60°C. Tras desparafinarlos, los portas se tratan con proteinasa K (100 µgml<sup>-1</sup>) en tampón TE (Tris 50 mM, EDTA [ácido etilendiaminotetraacético] 10 mM) a 37°C durante 30 minutos. Los portas se deshidratan por inmersión en diluciones seriadas de etanol y se secan al aire. A continuación, se cubren con tampón de hibridación (SSC [citrato salino estándar; NaCl 60 mM, NaCl 600 mM, pH 7] 4x, formamida al 50%, solución de Denhardt 1x, 250 µgml<sup>-1</sup> de ARNt de levadura, sulfato de dextrano al 10%) que contenga 20 ng de la sonda marcada con digoxigenina. Tras la desnaturalización durante 5 minutos a 95°C, se lleva a cabo la hibridación incubando los portas en una cámara húmeda durante toda la noche a 42°C. La sonda se produce mediante PCR utilizando el par de cebadores Bo-Boas anteriormente descrito con incorporación de digoxigenina. La PCR se lleva a cabo como se ha descrito en el apartado sobre la PCR excepto por el hecho de que se añade DIG dUTP 25 mM a la mezcla de reacción. Los pasos de la detección se realizan según las instrucciones del fabricante.

En otro protocolo de ISH se utiliza un cóctel de tres sondas 5' marcadas con digoxigenina específicas de miembros estrechamente relacionados del grupo de *B. exitiosa*–*B. roughleyi* (Hill *et al.*, 2010). No obstante, esta prueba no está del todo validada.

**Controles positivos/negativos:** son obligatorios. Los controles positivos son: 1) ISH en el hospedador infectado; 2) ISH inespecífico (ADNr de la SSU) en las muestras. Los controles negativos son: 3) reacciones de ISH sin sonda; 4) ISH en hospedadores no infectados. Los controles positivos pueden adquirirse solicitándolos al Laboratorio de Referencia de la OIE.

Niveles de validación:

- **Especificidad y sensibilidad:** la especificidad es más alta que la de los métodos histocitológicos. No obstante, la sonda Bo-boas también permite detectar *Haplosporidium nelsoni* en *Crassostrea*



*virginica*, y *B. ostreae* en *O. edulis*, aunque no *Mikrocytos mackini* en *C. gigas* (Carnegie y Cochenec-Laureau, 2004; Cochenec *et al.*, 2000).

- **Método de referencia:** en comparación con la combinación de histología e improntas, y teniendo en cuenta que estas técnicas ofrecen un 100% de sensibilidad y de especificidad, la ISH tiene una sensibilidad del 100% (superior a la de la PCR) y una especificidad del 27,3% (Diggles *et al.*, 2003).

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo corresponde a parásitos marcados de color oscuro dentro de los hemocitos, cuando todos los controles negativos dan un resultado negativo y todos los positivos, un resultado positivo.
- En especies susceptibles de la zona en la que se sabe que existe infección por *B. exitiosa*, un resultado positivo en *O. chilensis* o en *O. angasi* indica infección por *B. exitiosa*, pero en *O. edulis* puede indicar infección tanto por *B. exitiosa* como por *B. ostreae*.
- En otras especies o fuera de la zona geográfica en la que se sabe que existe infección por *B. exitiosa*, un resultado positivo indica infección por una especie del género *Bonamia* que tendrá que confirmarse en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

**Disponibilidad de pruebas comerciales:** kit de detección de ácidos nucleicos con DIG (Boehringer Mannheim).

#### 4.3.1.2.3.3. Secuenciación

La secuenciación se recomienda como uno de los pasos finales para la confirmación del diagnóstico. Las regiones de acceso son el ADNr de la SSU y el ITS1. Aunque en las genotecas públicas se dispone de las secuencias, se recomienda pasar estos casos al Laboratorio de Referencia de la OIE correspondiente.

#### 4.3.1.2.4. Purificación del agente

Ninguna.

### 4.3.2. Métodos serológicos

Ninguno aplicable.

## 5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

A modo de ejemplo, los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida y el diagnóstico de la infección por *B. exitiosa* se detallan en la Tabla 5.1. Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a =el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b= el método es estándar, con buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d= el método no se recomienda actualmente para este fin. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales, su naturaleza sistemática y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

**Tabla 5.1.** Métodos de vigilancia dirigida y diagnóstico

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	PL	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	d	c	c	c	d
Improntas de tejidos	d	d	a	a	a	c
Histopatología	d	d	a	a	a	c
Me de transmisión	d	d	d	d	d	b
Sondas de ADN – <i>in situ</i>	d	d	d	d	d	b

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	PCR y PCR TaqMan	a	a	a	a	a
PCR-RFLP	d	d	d	d	d	b
Secuenciación	d	d	d	d	d	a

PL = postlarvas; ME = microscopía electrónica; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; RFLP = análisis de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción.

## 6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de infección por *Bonamia exitiosa*

Los métodos prescritos para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de infección, como se indica en el *Código Acuático*, son: improntas de tejidos (corazón o branquias), histología o PCR en zonas solo infectadas por *B. exitiosa*. Sin embargo, en zonas donde coexisten *B. exitiosa* y *B. ostreae*, un resultado positivo en la histología tiene que confirmarse mediante caracterización molecular.

## 7. Criterios de diagnóstico confirmativo

### 7.1. Definición de caso sospechoso

Todos los casos que den un resultado positivo obtenido por cualquier técnica de diagnóstico deben considerarse sospechosos.

### 7.2. Definición de caso confirmado

En especies susceptibles de la zona geográfica donde se sabe que existe infección por *B. exitiosa*, un caso confirmado de *B. exitiosa* es el que da un resultado positivo en improntas de tejidos, histología o hibridación *in-situ* junto con un resultado positivo en la PCR-RFLP y en la secuenciación.

En otras especies hospedadores o fuera de la zona donde se sabe que existe infección por *B. exitiosa*, se recomienda una confirmación por MET. No obstante, esta técnica solo es adecuada para las muestras intensamente infectadas.

## 8. Bibliografía

ABOLLO E., RAMILO A., CASAS S.M., COMESAÑA P., CAO A., CARBALLAL M.J. & VILLALBA A. (2008). First detection of the protozoan parasite *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) infecting flat oyster *Ostrea edulis* grown in European waters. *Aquaculture*, **274**, 201–207.

ARZUL I., LANGLADE A., CHOLLET B., ROBERT M., FERRAND S., OMNES E., LEROND S., COURALEAU Y., JOLY J.-P., FRANÇOIS C. & GARCIA C. (2010). Can the protozoan parasite *Bonamia ostreae* infect larvae of flat oysters *Ostrea edulis*? *Vet. Parasitol.*, doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.060

BERTHE F.C.J. & HINE P.M. (2003). *Bonamia exitiosa* Hine *et al.*, 2001 is proposed instead of *B. exitiosus* as the valid name of *Bonamia* sp. infecting flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Dis. Aquat. Org.*, **57**, 181.

BURRESON E.M., STOKES N.A., CARNEGIE R.B. & BISHOP M.J. (2004). *Bonamia* sp. (Haplosporidia) found in nonnative oysters *Crassostrea ariakensis* in Bogue Sound, North Carolina. *J. Aquat. Anim. Health*, **16**, 1–9.

CAMPALANS M., ROJAS P. & GONZALEZ M. (2000). Haemocytic parasitosis in the farmed oyster *Tiostrea chilensis*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **20**, 31–33.

CARNEGIE R.B., BURRESON E.M., HINE P.M., STOKES N.A., AUDEMARD C., BISHOP M.J. & PETERSON C.H. (2006). *Bonamia perspora* n. sp. (Haplosporidia), a parasite of the oyster *Ostreaola equestris*, is the first *Bonamia* species known to produce spores. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **53**, 232–245.

CARNEGIE R.B. & COCHENNEC-LAUREAU N. (2004). Microcell parasites of oysters: Recent insights and future trends. *Aquat. Living Res.*, **17**, 519–528.

- COCHENNEC N., LE ROUX F., BERTHE F. & GERARD A. (2000). Detection of *Bonamiaostreae* based on small subunit ribosomal probe. *J. Invertebr. Pathol.*, **76**, 26–32.
- COCHENNEC N., REECE K.S., BERTHE F.C.J. & HINE P.M. (2003). Revisiting *Mikrocytos roughleyi* taxonomic affiliation points to the genus *Bonamia* (Haplosporidia). *Dis. Aquat. Org.*, **54**, 209–217.
- CORBEIL S., ARZUL I., DIGGLES B., HEASMAN M., CHOLLET B., BERTHE F.C. & CRANE M.S. (2006a). Development of a TaqMan PCR assay for the detection of *Bonamia* species. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 75–80.
- CORBEIL S., ARZUL I., ROBERT M., BERTHE F.C.J., BESNARD-COCHENNEC N. & CRANE M.S.J. (2006b). Molecular characterization of an Australian isolate of *Bonamia exitiosa*. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 81–85.
- CRANFIELD H.J., DUNN A., DOONAN I.J. & MICHAEL K.P. (2005). *Bonamia exitiosa* epizootic in *Ostrea chilensis* from Foveaux Strait, southern New Zealand between 1986 and 1992. *ICES J. Mar. Sci.*, **62**, 3–13.
- DIGGLES B.K., COCHENNECLAUREAU N. & HINE P.M. (2003). Comparison of diagnostic techniques for *Bonamia exitiosus* from flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Aquaculture*, **220**, 145–156.
- DIGGLES B.K. & HINE P.M. (2002). *Bonamia exitiosus* epidemiology in Foveaux Strait oysters. Final research report, OYS1999/01, Ministry of Fisheries, New Zealand. 51 pp. (unpublished report held in NIWA library, Wellington).
- DINAMANI P., HINE P.M. & JONES J.B. (1987). Occurrence and characteristics of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in the New Zealand dredge oyster *Tiostrea lutaria*. *Dis. Aquat. Org.*, **3**, 37–44.
- DOONAN I.J., CRANFIELD H.J. & MICHAEL K.P. (1994). Catastrophic reduction of the oyster, *Tiostrea chilensis* (Bivalvia: Ostreidae), in Foveaux strait, New Zealand, due to infestation by the protistan *Bonamia* sp. *NZ J. Mar. Freshwater Res.*, **28**, 335–344.
- FARLEY C.A., WOLF P.H. & ELSTON R.A. (1988). A long-term study of 'microcell' disease with a description of a new genus, *Mikrocytos* (g. n.), and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp. n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp. n.). *Fishery Bull.*, **86**, 581–593.
- HILL K.M., CARNEGIE R.B., ALOUI-BEJAOUI N., EL GHARSALLI R., WHITE D.M., STOKES N.A. & BURRESON G.M. (2010). Observation of a *Bonamia* sp. infecting the oyster *Ostrea stentina* in Tunisia, and a consideration of its phylogenetic affinities. *J. Invertebr. Pathol.*, **103**, 179–185.
- HINE P.M. (1991a). The annual pattern of infection by *Bonamia* sp. in New Zealand flat oysters, *Tiostrea chilensis*. *Aquaculture*, **93**, 241–251.
- HINE P.M. (1991b). Ultrastructural observations on the annual infection pattern of *Bonamia* sp. in flat oysters *Tiostrea chilensis*. *Dis. Aquat. Org.*, **11**, 163–171.
- HINE P. M. (1996). The ecology of *Bonamia* and decline of bivalve molluscs. *NZ J. Ecol.*, **20**(1), 109–116.
- HINE P.M. (2002). Severe apicomplexan infection in the oyster *Ostrea chilensis*: a predisposing factor in bonamiosis. *Dis. Aquat. Org.*, **51**, 49–60.
- HINE P.M., COCHENNEC-LAUREAU N. & BERTHE F.C.J. (2001). *Bonamia exitiosus* n. sp. (Haplosporidia) infecting flat oysters *Ostrea chilensis* (Philippi) in New Zealand. *Dis. Aquat. Org.*, **47**, 63–72.
- HINE P.M., DIGGLES B.K., PARSONS M.J.D., PRINGLE A. & BULL B. (2002). The effects of stressors on the dynamics of *Bonamia exitiosus* Hine, Cochennec-Laureau and Berthe, infections in flat oysters *Ostrea chilensis* (Philippi). *J. Fish Dis.*, **25**, 545–554.
- HINE P.M. & JONES J.B. (1994). *Bonamia* and other aquatic parasites of importance to New Zealand. *NZ J. Zool.*, **21**, 49–56.
- HINE P.M. & WESNEY B. (1994). Interaction of phagocytosed *Bonamia* sp. (Haplosporidia) with haemocytes of oysters *Tiostrea chilensis*. *Dis. Aquat. Org.*, **20**, 219–229.
- KROECK M.A. & MONTES J. (2005). Occurrence of the haemocyte parasite *Bonamia* sp in flat oysters *Ostrea puelchana* farmed in San Antonio Bay (Argentina). *Dis. Aquat. Org.*, **63**, 231–235.

LYNCH S.A., ABOLLO E., RAMILLO A., CAO A., CULLOTY S.C. & VILLALBA A. (2010). Observations raise the question if the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, can act as either a carrier or a reservoir for *Bonamia ostreae* or *Bonamia exitiosa*. *Parasitology*, **137**, 1515–1526.

MIALHE E., BOULO V., ELSTON R., HILL B., HINE M., MONTES J., VAN BANNING P. & GRIZEL H. (1988). Serological analysis *Bonamia* in *Ostrea edulis* and *Tiostrea lutaria* using polyclonal and monoclonal antibodies. *Aquat. Living Res.*, **1**, 67–69.

NARCISI V., ARZUL I., CARGINI D., MOSCA F., CALZETTA A., TRAVERSA D., ROBERT M., JOLY J.P., CHOLLET B., RENAULT T. & TISCAR P.G. (2010). Detection of *Bonamia ostreae* and *Bonamia exitiosa* (*Haplosporidia*) in *Ostrea edulis* from the Adriatic Sea (Italy). *Dis. Aquat. Org.*, **89**, 79–85.

PICHOT Y., COMPS M., TIGE G., GRIZEL H. & RABOUIN M.A. (1979). Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau de l'huitre plate *Ostrea edulis* L. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, **43**, 131–140.

\*  
\* \*

**NB:** Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Infección por *Bonamia exitiosa* (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: [www.oie.int](http://www.oie.int)).